

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-30183

(P2006-30183A)

(43) 公開日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/68 (2006.01)  
A 6 1 B 10/00 (2006.01)

F 1

G O 1 N 33/68  
A 6 1 B 10/00

テーマコード(参考)

2 G O 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2005-197634 (P2005-197634)

(22) 出願日 平成17年7月6日 (2005.7.6)

(31) 優先権主張番号 04015935.2

(32) 優先日 平成16年7月7日 (2004.7.7)

(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. W I N D O W S

(71) 出願人 591003013

エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー

F. HOFFMANN-LA ROCHE

E AKTIENGESELLSCHAFT

T

スイス・シーエイチ-4070バーゼル・

グレンツアーヘルストラツセ124

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型および2型糖尿病に対する、P1GFに基づく多重マーカーパネル

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】糖尿病患者が心臓血管合併症に罹患しているか又は心臓血管合併症に罹患するリスクを有するかを診断するための方法を提供する。

【解決手段】 a) 該患者由来のサンプル中の少なくとも1つの血管新生マーカーまたはその変異体のレベルを、好ましくはin vitroで測定し、b) 心臓血管合併症またはそのリスクに関連している既知レベルと該測定レベルとを比較することにより、心臓血管合併症を又は心臓血管合併症に罹患するリスクを診断する方法。また、血管新生マーカー、心臓ホルモン、ナトリウム利尿ペプチド、および血小板活性化に関するマーカーを含むマーカーの測定の組合せに関する。好ましいマーカーはP1GF、VEGF、脳性ナトリウム利尿ペプチド(特にNT-proBNP)、およびsCD40Lである。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

糖尿病患者が心臓血管合併症に罹患しているか又は心臓血管合併症に罹患するリスクを有するかを診断するための方法であって、

a) 該患者由來のサンプル中の少なくとも1つの血管新生マーカーまたはその変異体のレベルを *in vitro*で測定し、

b) 心臓血管合併症またはそのリスクに関連している既知レベルと該測定レベルとを比較することにより、心臓血管合併症を又は心臓血管合併症に罹患するリスクを診断する、各ステップを含んでなる方法。

**【請求項2】**

血管新生マーカーがP1GF、VEGFまたはその変異体である、請求項1記載の方法。

**【請求項3】**

血管新生マーカーがP1GFまたはその変異体である、請求項1記載の方法。

**【請求項4】**

患者が1型糖尿病に罹患している、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

**【請求項5】**

患者が2型糖尿病に罹患している、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

**【請求項6】**

患者が糖尿病性腎症に罹患している、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

**【請求項7】**

さらに、心臓ホルモンの群に属する少なくとも1つのマーカーのレベルを測定する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

**【請求項8】**

心臓ホルモンがナトリウム利尿ペプチドまたはその変異体である、請求項7記載の方法。

。

**【請求項9】**

心臓ホルモンがNT-proBNPまたはその変異体である、請求項8記載の方法。

**【請求項10】**

P1GFおよびNT-proBNP、またはそれらの変異体のレベルを測定する、請求項9記載の方法。

。

**【請求項11】**

さらに、血小板活性化のマーカーの群に属する少なくとも1つのマーカーのレベルを測定する、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。

**【請求項12】**

血小板活性化のマーカーがsCD40Lまたはその変異体である、請求項11記載の方法。

**【請求項13】**

P1GFおよびNT-proBNPおよびsCD40Lまたはそれらの変異体のレベルを測定する、請求項12記載の方法。

**【請求項14】**

さらに、CRP、hsCRP、IL-6、またはその変異体、グルコース、HbA1c、CMLおよびAGEよりなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーのレベルを測定する、請求項1～13のいずれか1項記載の方法。

**【請求項15】**

心臓血管合併症、心疾患、細小血管症、血小板活性化、炎症および不十分な血糖値抑制よりなる群に属する、糖尿病の症状の診断を含む、請求項1～14のいずれか1項記載の方法。

。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、糖尿病に罹患した患者のリスク層別化に関する。

**【背景技術】****【0002】**

現在、糖尿病患者は、一般には、1型および2型糖尿病患者のみに分けられた均一な群として治療されている。実際には、糖尿病患者は、非常に不均一な群を構成している。多数の患者は、心臓血管疾患または炎症疾患のような併存疾患 (co-morbidity) を有する。これらの患者の要求を満たすためには、より個別化された治療計画が必要とされている。しかし、個別化治療は、何からの併存疾患の信頼しうる診断、あるいは、疾患の予後に関与するまたは個々の患者に存在する特定の疾患に由来する合併症を示す特定の若しくは主たる徵候の信頼しうる診断が前提条件となる。

**【0003】**

現在の診断手段はこれらの目的には不十分である。例えば、心臓血管疾患は一般開業医により頻繁に誤診されている (Svendstrup Nielsen, L. ら, (2003). N-terminal pro-brain natriuretic peptide for discriminating between cardiac and non-cardiac dyspnoea. The European Journal of Heart Failure)。したがって、簡便かつ信頼しうる診断手段が、特に、一般開業医および／または糖尿病のケアを専門とする医師に必要とされている。

**【0004】**

診断のための生化学的または分子的マーカーの使用自体は公知である。しかし、糖尿病は、多数の身体機能の障害を引き起こし、その結果、潜在的な生化学的または分子的マーカーのレベルを搅乱する。どのマーカーが糖尿病患者の生理的または病的状態に関する貴重な情報を提供するのかは知られていない。

**【0005】**

免疫組織化学を用いて、Khaliq ら (1998) は、血管新生網膜前膜に隣接した糖尿病性網膜の表在性の網膜血管において胎盤増殖因子 (P1GF) が観察されたことを記述した。P1GF の局在化は、血管新生増殖の形跡を全く示さなかった糖尿病性網膜においては弱いかまたは不在であった (Khaliq, A., Foreman, D., Ahmed, A., Weich, H., ら (1998). Increased Expression of Placenta Growth Factor in Proliferative Diabetic Retinopathy. Laboratory Investigation, vol. 78(1), pp. 109-116)。同じ研究において、P1GF は糖尿病性硝子体サンプルに存在するものの、対照サンプルからは検出できなかったことが記述された。

**【0006】**

脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) が糖尿病患者における生化学的マーカーとして使用可能であるかどうかを確認するための試みがなされている。Yano ら (1999) は、BNP が 2 型糖尿病患者における腎合併症の指標となりうることを見出した (Yano Y., Katsuki, A. ら, (1999). Plasma Brain natriuretic peptide levels in normotensive noninsulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol. 84(7), pp. 2353-2356)。この知見は Isotani ら (2000) により疑問視されており、血漿 BNP の増加は、むしろ、心不全の指標であると Isotani らは考えている (Isotani H., Kameoka K. ら, (2000). Plasma Brain Natriuretic Peptide levels in normotensive type 2 diabetic patients without cardiac disease. Diabetes Care, vol. 23(6), pp. 859-860)。Siebenhofer ら (2002) は、正常血圧性の 2 型糖尿病患者における研究が、微小アルブミン尿症を有する患者における BNP レベルの上昇に関して結論を導くものではない、ことを提示している。Siebenhofer ら (2002) は、アルブミン尿症を有する 1 型糖尿病患者においては NT-proBNP レベルが増加していることを見出した。糖尿病性腎症および他の併存疾患の患者における NT-proBNP の役割は明らかではない、とその著者らは結論づけている。

**【0007】**

糖尿病患者は、しばしば、神経障害に罹患しており、疼痛感受性の欠乏を伴うため、糖尿病患者においては、心臓血管合併症が、気づかれずに放置されてしまうことが多い。例えば、糖尿病患者は、特徴的な症状である胸痛を経験することなく心疾患に罹患している

ことがある。

【0008】

また、いくつかの糖尿病薬は、心臓毒性作用（例えば、血液容量を増加させることによるもの）を有することがあり、心臓血管合併症に罹患していない患者または心臓血管合併症に罹患するリスクを有しない患者にのみ投与すべきである。

【0009】

したがって、糖尿病患者における併存疾患、特に心臓血管合併症のリスク層別化および／または同定のための方法および手段を提供することが、本発明の目的である。

【発明の開示】

【0010】

第1の実施形態においては、糖尿病患者が心臓血管合併症に罹患しているか又は心臓血管合併症に罹患するリスクを有するかを診断するための方法であって、

a) 該患者由来のサンプル中の少なくとも1つの血管新生マーカーのレベルを、好ましくはin vitroで測定し、

b) 心臓血管合併症またはそのリスクに関連している既知レベルと該測定レベルとを比較することにより、心臓血管合併症を又は心臓血管合併症に罹患するリスクを診断する、各ステップを含んでなる方法により、この課題を解決する。

【0011】

この方法はまた、患者からサンプル、例えば体液または組織サンプルを採取するステップを含みうる。本発明においては、サンプルの採取は、好ましくは、非医療従事者（すなわち、医師の職業を行うのに必要な教育を受けていない従事者）により行われる。これは特に、サンプルが血液である場合に当てはまる。

【0012】

本発明は、一般開業医、専門医および糖尿病治療を専門とする病棟、科または診療所にとって特に有用である。なぜなら、彼らは、心臓病専門医による集中的な心臓病学的検査を利用できない場合が多いからである。本発明は、そのような非心臓病専門医のために、心臓血管合併症に罹患するリスクを有する患者に関する糖尿病患者の簡便かつ信頼しうるスクリーニングのための方法および手段を提供する。

【0013】

本発明は、糖尿病患者における及び更には神経障害に罹患している糖尿病患者における、心臓血管合併症（心疾患、細小血管症、血小板活性化および炎症が含まれる）を検出するための簡便な方法および手段を提供する。検出は合併症の初期段階において可能であり、不可逆的損傷が生じる前でさえも可能である。

【0014】

本発明は、特定の生化学的または分子的マーカーを利用する。「生化学的マーカー」および「分子マーカー」なる語は当業者に公知である。特に、生化学的または分子的マーカーは、特定の症状、疾患または合併症の存在または非存在下で異なって発現（すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート）される遺伝子発現産物である。通常、分子的マーカーは核酸（例えば、mRNA）として定義され、一方、生化学的マーカーはタンパク質またはペプチドである。適当な生化学的または分子的マーカーのレベルは症状、疾患または合併症の存在または非存在を示すことが可能であり、したがって診断を可能にする。

【0015】

本発明における糖尿病は、すべての形態の糖尿病を意味し、1型、2型および妊娠性糖尿病が含まれる。特に、糖尿病は1型および2型糖尿病を意味する。糖尿病の定義は当業者に公知であり、診断基準は世界保健機関（WHO）により1985年および1999年に、またAmerican Diabetes Association（ADA）により1997年に確立されている。これらの定義の基準を1以上満たすあらゆる患者が糖尿病患者とみなされる。好ましくは、糖尿病患者はWHOの1999年の基準により定義される。

【0016】

1型糖尿病は若年型糖尿病またはインスリン依存型糖尿病（IDDM）としても知られている。1型糖尿病は免疫学的に生じることがあり（サブタイプA）、および／またはそれは特発性でありうる（サブタイプB）。2型糖尿病は成人発病型糖尿病またはインスリン非依存型糖尿病（NIDDM）としても知られている。2型糖尿病は肥満を伴っていたり（2a型）または肥満を伴わないことがある（2b型）。他の型の糖尿病は、例えば遺伝的欠損、外分泌腎臓の疾患、内分泌疾患および化学物質または医薬の影響により引き起こされる。

【0017】

本発明による診断には、関連疾患、合併症またはリスクを判定し、モニターし、確認し、細分類しさらに予測することが含まれる。判定は、疾患、合併症またはリスクが認識されるようになることを意味する。モニターすることは、例えば、疾患の進行を又は疾患もしくは合併症の進行に対する特定の治療の影響を分析するために、既に診断された疾患または合併症を追跡し続けることを意味する。確認は、他の指標またはマーカーを使用して、既に行った診断を補強または確証することを意味する。細分類は、診断された疾患の別の下位概念（例えば、該疾患の軽度および重度の形態）により診断を更に明確化することを意味する。予測は、他の症状もしくはマーカーが明らかとなる前または有意に変化する前の、疾患または合併症の予後を意味する。

【0018】

本発明における「患者」なる語は、健康な個体、見掛け上健康な個体、または特に、糖尿病に罹患した個体を意味する。特に、患者は1型糖尿病、2型糖尿病および／もしくは糖尿病性腎症に罹患しているか、または2型糖尿病および／もしくは糖尿病性腎症について治療を受けている。より一層詳しくは、患者は心臓血管合併症の既往歴がなく、および／または心臓血管合併症について治療されていない。

【0019】

本発明は、糖尿病患者が心臓血管合併症に罹患しているか又は心臓血管合併症に罹患するリスクを有するかを診断できるようにする。本発明における「心臓血管合併症に罹患」には、既存の心臓血管合併症の悪化も含まれる。

【0020】

「心臓血管合併症」は、当業者に公知のあらゆる心臓血管疾患またはイベントであり、心疾患、細小血管症または血小板活性化が含まれる。

【0021】

本発明は、血管新生マーカー、心臓ホルモン、および血小板活性化に関するマーカーを、生化学的および分子的マーカーとして利用する。

【0022】

本発明の第1の態様において、血管新生マーカー、特にPIGFが、生化学的または分子的マーカーとして、糖尿病患者における心臓血管合併症、特に細小血管症の優れた指標となることが判明した。また、細小血管症のマーカーが、糖尿病患者における心臓血管疾患の死亡率の指標となることが見いだされた。

【0023】

のことから、本発明は、心臓血管合併症(さらに特定すると細小血管症)又は心臓血管合併症に罹患するリスクを診断するために、血管新生マーカーのレベルを測定することに関する。

【0024】

したがって、本発明は糖尿病患者における「細小血管症」の診断を可能にする。細小血管症は糖尿病の結果として頻繁に見られ、糖尿病性細小血管症としても知られている。細小血管症は、主として腎臓および網膜に生じる。腎臓の細小血管症は糖尿病性腎症を引き起こすことがあり、これはアルブミン尿（尿アルブミン排泄の増加）、高血圧、および糸球体硬化症に起因する進行性腎不全により特徴づけられる。網膜の細小血管症は、やがては網膜血管増殖、網膜出血および失明を引き起こしうる。細小血管症のもう1つの結果は四肢の低酸素症（典型的には、「糖尿病性足」として知られる）であり、これは壞疽を招くことがあり、四肢の切断を要することがある。

**【0025】**

したがって、血管新生マーカーは糖尿病性腎症、糖尿病性網膜損傷または四肢の低酸素症の診断をも可能にする。

**【0026】**

好ましい血管新生マーカーは、PIGF（胎盤増殖因子）、VEGF（血管内皮増殖因子）、sF1t1（可溶性fms様チロシンキナーゼ1）およびそれらの変異体である。最も好ましい血管新生マーカーはPIGFおよびその変異体である。

**【0027】**

この場合の「変異体」なる語は、前記ペプチドに実質的に類似したペプチドを意味する。「実質的に類似」なる語は当業者に十分に理解されている。特に、変異体は、ヒト集団における最も優勢なペプチドアイソフォームのアミノ酸配列と比較してアミノ酸の置換を示すアイソフォームまたは対立遺伝子でありうる。好ましくは、そのような実質的に類似したペプチドは、そのペプチドの最も優勢なアイソフォームに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列類似性を有する。実質的に類似しているものとしては、診断手段により又はそれぞれの完全長ペプチドに対するリガンドにより尚も認識される分解産物、例えばタンパク質分解産物も挙げられる。

**【0028】**

変異体の例は公知である。例えば、NT-proANPおよびNT-proBNPの具体的な変異体ならびにそれらの測定方法が既に記載されている(Ala-Kopsala, M., Magga, J., Peuhkurinen, K.ら (2004): Molecular heterogeneity has a major impact on the measurement of circulating N-terminal fragments of A-type and B-type natriuretic peptides. Clinical Chemistry, vol. 50(9), 1576-1588)。

**【0029】**

この場合の「変異体」なる語はスプライス変異体をも意味する。例えば、PIGFの公知スプライス変異体としては、PIGF-1 (149アミノ酸)、PIGF-2 (170アミノ酸) およびPIGF-3 (221アミノ酸) が挙げられる(例えば、Cai, J., Ahmad, S., Jiang, W.G., Huang, J.ら, (2003). Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Sustains Angiogenesis and Bcl-2 Expression via the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Endothelial Cells. Diabetes, vol. 52, pp.2959-2968を参照されたい)。

**【0030】**

「変異体」なる語は、翻訳後修飾されたペプチド、例えばグリコシル化またはリン酸化ペプチドをも意味する。「変異体」はまた、サンプルの回収後に修飾されたペプチドであり、例えば、ペプチドに標識(特に、放射能または蛍光標識)を共有結合または非共有結合により結合させたものである。

**【0031】**

もう1つの実施形態においては、本発明は、血管新生マーカーのレベルの測定、ならびにさらに、心臓ホルモンおよび/または血小板活性化に関するマーカーのレベルの測定に関する。

**【0032】**

本発明において、心臓ホルモン、特にNT-proBNPが、生化学的または分子的マーカーとして、糖尿病患者における心臓血管合併症、特に心疾患の存在を強く示すことが見いだされた。

**【0033】**

心疾患に罹患した患者は、安定狭心症(SAP)に罹患した患者および急性冠状動脈症候群(ACS)を有する個体でありうる。ACS患者は不安定狭心症(UAP)を示すことがあり、あるいはこれらの個体は心筋梗塞(MI)に既に罹患している。MIはST上昇性MIまたは非ST上昇性MIでありうる。MIの発生の後、左心室機能不全(LVD)が生じうる。最終的に、LVD患者は、約15%の死亡率を有するうつ血性心不全(CHF)になる。

**【0034】**

心疾患は、New York Heart Association (NYHA) により機能分類系に分類されている。クラスIの患者は心疾患の明らかな症状を有しない。身体活動は制約されず、日常的身体活動は、過度な疲労、動悸または呼吸困難（息切れ）を引き起こさない。クラスIIの患者は身体活動の若干の制約を有する。彼らは安静時には病状が安定しているが、通常の身体活動は疲労、動悸または呼吸困難を引き起こす。クラスIIIの患者は身体活動の顕著な制約を示す。彼らは安静時には病状が安定しているが、通常未満の活動が疲労、動悸または呼吸困難を引き起こす。クラスIVの患者は、不快感を伴わずにいざれの身体活動を行うこともできない。彼らは安静時に心不全の症状を示す。いざれかの身体活動を行うと、不快感が増強する。

#### 【0035】

したがって、患者を、臨床症状を示さない個体と、症状（例えば、呼吸困難）を示す個体とに分けることができる。

#### 【0036】

心疾患のもう1つの特徴は、「駆出分画」としても公知の「左心室駆出分画」（LVEF）である。健康な心臓を有する人は通常、損なわれていないLVEFを有し、それは一般に、50%を超えると示されている。症候的である収縮性心疾患を有するほとんどの人は、一般には、40%以下のLVEFを有する。LVEFが損なわれた結果として、二次合併症、例えば肺うつ血またはうつ血肺が生じる。

#### 【0037】

心疾患は糖尿病性大血管症によっても生じる。糖尿病性大血管症は非糖尿病患者の動脈硬化症に類似している。しかし、それはより重度であり、発現がより早期であり、より頻繁である。したがって、本発明の「心疾患」は糖尿病性大血管症をも意味する。

#### 【0038】

本発明においては、「心疾患」は特に、冠状動脈心疾患、SAP、ACS、UAP、MI、ST上昇性MI、非ST上昇性MI、LVDまたはCHFを意味する。

#### 【0039】

より詳しくは、「心疾患」は、ACS、UAP、MI、ST上昇性MI、非ST上昇性MI、LVDまたはCHFを意味する。

#### 【0040】

本発明の心疾患は、症状、特に、NYHAクラスII～IVの症状、より詳しくは、NYHAクラスIII～IVの症状を引き起こしうる。

#### 【0041】

心疾患は40%以下のLVEFを伴う。

#### 【0042】

心疾患は「代償性」または「非代償性」でありうる。代償性は、身体の正常な酸素要求性が尚も満たされうることを意味し、これに対して非代償性は、身体の正常な酸素要求性が、もはや満たされないことを意味する。

#### 【0043】

本発明における心臓ホルモンはナトリウム利尿ペプチド、ウロテンシン（urotensin）およびその変異体を含む。特に、本発明における心臓ホルモンはナトリウム利尿ペプチドである。また、生化学的マーカーとしての任意的心臓ホルモンまたはナトリウム利尿ペプチドの組合せの利用が本発明において考慮される。

#### 【0044】

本発明におけるナトリウム利尿ペプチドは、ANP型およびBNP型ペプチドならびにそれらの変異体を含む（例えば、Bonow, R.O. (1996). New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation 93: 1946-1950を参照されたい）。

#### 【0045】

ANP型ペプチドはpre-proANP、proANP、NT-proANP、ANPおよびそれらの変異体を含む。

#### 【0046】

BNP型ペプチドはpre-proBNP、proBNP、NT-proBNP、BNPおよびそれらの変異体を含む。

**【0047】**

「変異体」という語は、本明細書で前記に定義した意味である。

**【0048】**

プレプロペプチド（pre-proBNPの場合には134アミノ酸）は短いシグナルペプチドを含み、これは酵素により切断されてプロペプチド（proBNPの場合には108アミノ酸）を遊離する。このプロペプチドは更に切断されてN末端プロペプチド（NT-proBNPの場合には76アミノ酸のNT-プロペプチド）および活性ホルモン（BNPの場合には32アミノ酸、ANPの場合には28アミノ酸）となる。

**【0049】**

本発明における好ましいナトリウム利尿ペプチドはNT-proANP、ANP、NT-proBNP、BNPおよびそれらの変異体である。ANPおよびBNPは活性ホルモンであり、それらに対応するそれぞれの不活性対応物であるNT-proANPおよびNT-proBNPより短い半減期を有する。したがって、関心のある時間経過に応じて、活性形態または不活性形態の測定が有利となりうる。本発明における最も好ましいナトリウム利尿ペプチドはBNP型ペプチドおよびその変異体、特に、NT-proBNPおよびその変異体である。

**【0050】**

上述のように、本発明は、血管新生マーカーのレベルを測定すること、および、さらに心臓ホルモンおよび／または血小板活性化のマーカーのレベルを測定することに関する。

**【0051】**

本発明はまた、心臓血管合併症の診断のための、より詳しくは、血小板活性化の診断のための、血小板活性化に関するマーカーのレベルをさらに測定することに関する。

**【0052】**

したがって、本発明はまた、「血小板活性化」の診断に関する。本発明において「血小板活性化」は、あらゆる血栓形成イベントを意味し、血小板活性化、血小板凝集、血栓形成および血栓増殖が含まれる。これらの生物学的メカニズムは、既に不安定になっているplaqueが破壊され、左心室機能不全（LVD）、うっ血性心不全（CHF）および死亡を招きうる可逆的血管閉塞（UAP）または不可逆的血管閉塞（AMI）を引き起こすリスクの代表的なものである。

**【0053】**

したがって、血小板活性化のマーカーは、血小板凝集、血栓形成、血栓増殖、既に不安定になっているplaqueが破壊されるリスク、UAPおよびAMIの診断をも可能にする。

**【0054】**

血小板活性化に関する好ましいマーカーはsCD40L（可溶性CD40リガンド）、vWF（因子VIIIリブラント因子）およびそれらの変異体である。血小板活性化に関する最も好ましいマーカーはsCD40Lおよびその変異体である。「変異体」なる語は、本明細書中で既に定義されているとおりに理解されるべきである。

**【0055】**

sCD40L（およびその変異体）は「遊離」していてもよく又は血小板に結合していてもよい。血清中のsCD40Lを測定する場合には、遊離型および血小板結合型の両方のsCD40Lを測定する。血漿中のsCD40Lを測定する場合には、「遊離」 sCD40Lのみを測定する。本発明においては、遊離sCD40Lのレベルの測定が好ましい。

**【0056】**

好ましくは、血管新生マーカーおよび／または血小板活性化に関するマーカーを心臓ホルモンと共に測定する。異なるタイプのマーカーの測定は心臓血管合併症の診断の確認に役立ち、その心臓血管合併症が心疾患、細小血管症であるのか、または血小板活性化により特徴づけられるものであるか、に細分類できるようにする。

**【0057】**

したがって、本発明およびその種々の実施形態は心臓血管合併症の診断を可能にするばかりでなく、その心臓血管合併症が主として心疾患、細小血管症または血小板活性化に関連しているかどうかに細分類することも可能にする。

## 【0058】

「心疾患」、「細小血管症」および「血小板活性化」は、完全に独立した障害ではなく、それらは相互に関連していることが当業者に公知である。例えば、血小板活性化はやがては動脈閉塞および心疾患を招きうる。したがって、本発明は心臓血管合併症の主な特徴、病期および／または重症度の診断に関する。

## 【0059】

本発明の方法は、CRP、hsCRP、IL-6またはそれぞれの変異体、グルコースHbA1c、CML（ $N\epsilon$ （カルボキシメチル）リシン）およびAGE（進行性グリコシル化最終産物）よりなる群から選ばれる1以上のマーカーの測定を伴いうる。

## 【0060】

CRP（C反応性タンパク質）、hsCRP（高感受性C反応性タンパク質）、IL-6（インターロイキン6）およびそれらのそれぞれの変異体は一般的に炎症の存在を示す。血清中のこれらのマーカーのレベルの増加は心臓血管系における炎症過程をも示す。したがって、これらのマーカーのレベルの増加は心臓血管合併症の存在またはリスクを示す。したがって、CRP、hsCRP、IL-6またはそれらのそれぞれの変異体の測定は、心臓血管合併症の又は心臓血管合併症に罹患するリスクの診断のために、本発明における他のマーカーと組合せて用いることが可能である。

## 【0061】

グルコース、HbA1c、AGEまたはCMLのレベルの増加は主として、患者が血糖値をより良好に制御しなければならないことを示す。

## 【0062】

グルコースレベルの測定は、糖尿病患者の現在の血糖値を測定するために、日常的に用いられる。

## 【0063】

血糖の中期または長期の制御に関する情報はHbA1c、CMLまたはAGEの測定により得ることができる。

## 【0064】

HbA1cはヘモグロビンのグリコシル化された形態である。HbA1cのレベルが低ければ低いほど、糖尿病患者の血糖値は良好に制御されている。

## 【0065】

糖酸化産物CML（ $N\epsilon$ （カルボキシメチル）リシン）はタンパク質とグルコースとの長期にわたるインキュベーションから生じる。HbA1cと同様に、低レベルのCMLは糖尿病患者における血糖値の良好な制御を示す。

## 【0066】

AGE（進行性グリコシル化最終産物）も、タンパク質とグルコースとの長期にわたるインキュベーションから生じる。HbA1cやCMLと同様に、低レベルのAGEは糖尿病患者における血糖値の良好な制御を示す。また、AGEのレベルの増加は2型糖尿病の患者における冠状心疾患に関連すると示唆されている（Kilhovd, B.K.ら, (1999). Serum levels of Advanced Glycation End Products are Increased in Patients with type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease. Diabetes Care, vol. 22(9), p.1543-1548）。したがって、AGEの測定は、心臓血管合併症の又は心臓血管合併症に罹患するリスクの診断のために、本発明における他のマーカーと組合せて用いることが可能である。

## 【0067】

さらに、本発明の方法は、妊娠関連血漿タンパク質A（PAPP-A）、IL-8、IL-10、インターロイキン18（IL-18/IL-18b）、虚血性修飾アルブミン（ischemic modified albumin）（IMA）、心臓トロポニンI（cTnI）、心臓トロポニンT（cTnT）、ICAM-1（細胞間細胞接着分子1）、VCAM-1（血管細胞接着分子1）、脂肪酸結合タンパク質（FABP）、E-セレクチン、P-セレクチン、フィブリノーゲン、血清アミロイドA（SAA）、CK-MB（クレアチニナーゼ-筋脳）、MPO（ミエロペルオキシダーゼ）、LpPLA2（リポタンパク質結合ホスホリバーゼA2）、GP-BB（グリコーゲンホスホリラーゼイソ酵素BB）、IL1RA、TAFI（トロンビ

ン活性化纖維素溶解インヒビター)、可溶性フィブリン、抗oxLDL(酸化型低密度リポタンパク質に対する抗体)、MCP-1(单球化学走化性タンパク質-1)、プロコアグラント組織因子(TF)、MMP-9(マトリックスメタロプロテアーゼ9)、Ang-2(アンジオポエチニ-2)、bFGF(塩基性纖維芽細胞増殖因子)、VLDL(超低密度リポタンパク質)、PAI-1(プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1)よりなるマーカーの群から選ばれる1以上のマーカーの測定を伴いうる。

【0068】

本発明の方法は、患者における種々のリスク等級に関連した既知レベル(参照レベル)と測定レベルとを比較することにより、患者のリスクを診断するステップを含む。

【0069】

当業者であれば、心臓血管合併症、特に心疾患、細小血管症および/または血小板活性化の罹患の「存在」または「リスク」に関連したマーカーの既知レベルを決定することが可能である。そのようなレベルは、例えば実施例1および2または図1~7に記載のとおり、よく知られた方法により決定することが可能である。例えば、患者、特に糖尿病患者の集団における測定レベルの中央値を用いて、心臓血管合併症を有しない患者と、心臓血管合併症に罹患している又は心臓血管合併症に罹患するリスクを有する患者とを区別することが可能である。他の患者におけるレベルの評価(例えば集団研究における)は、参照レベル(すなわち既知レベル)を精緻化するのに、また合併症重症度の様々な等級またはリスクの様々な等級(例えば、「高い」または「非常に高い」リスク)を区別するのに役立ちうる。

【0070】

本発明において、この場合の「存在」なる語は、ある患者に心臓血管合併症が存在する確率に関連するものである。「リスク」は、ある患者に将来的に心臓血管合併症が生じる確率に関連するものである。「リスクが無い」は、将来的にも心臓血管合併症に罹患するリスクが明らかに存在しないことを意味する。

【0071】

後記の参照レベルは、患者のリスクを診断するための第1の指針としてのみ役立ちうる。例えば、ある患者のリスクはその特定の患者の心臓の予備拍出能(spare pumping capacity)にも左右される。

【0072】

さらに、当業者であれば、後記で更に示す実施例から他の参照レベルを決定することができる。

【0073】

参照レベルの値は診断の所望の感度または特異性にも左右されうる。所望の感度が高ければ高いほど、診断の特異性は低くなり、その逆もまた然りである。例えば、より高い参照NT-proBNPレベルは心臓血管合併症の罹患の存在またはリスクの診断の特異性を増加させるが、その感度の低下を招きうる。

【0074】

典型的には、10pg/ml未満、特に5pg/ml未満の血漿PIGFレベルが、心臓血管合併症に罹患するリスクが無いことに関連している。

【0075】

典型的には、10pg/mlより高い、特に15pg/mlより高い、さらに特定すると20pg/mlより高い血漿PIGFレベルが、心臓血管合併症に罹患するリスクに関連している。

【0076】

PIGFの測定レベルが高ければ高いほど、患者のリスクも高くなる。例えば、25pg/mlを超えるレベルは、高いリスクを示し、30pg/mlを超えるレベルは、非常に高いリスクを示す。

【0077】

典型的には、33pg/ml未満、特に20pg/ml未満、より詳しくは15pg/ml未満の血漿NT-proBNPレベルが、心臓血管合併症に罹患するリスクが無いこと(無リスク)に関連している。

**【0078】**

典型的には、33pg/mlより高い、特に125pg/mlより高い、さらに特定すると500pg/mlより高い血漿NT-proBNPレベルが、心臓血管合併症に罹患するリスクに関連している。

**【0079】**

NT-proBNPの測定レベルが高ければ高いほど、患者のリスクも高くなる。例えば、1000pg/mlを超えるレベルは、高いリスクを示し、5000pg/mlを超えるレベルは、非常に高いリスクを示す。

**【0080】**

存在またはリスクが診断されたら、後記のとおり、それは後続の治療に影響を及ぼしうる。特に、本発明は、糖尿病の主な特徴または徵候に従い治療を個別化することを可能にする。したがって、本発明はまた、治療方法に関する。この場合の「治療」は、個体の病態生理学的状態を改変しうる任意の治療を意味し、例えば、医薬の投与および外科的治療が含まれる。

**【0081】**

本発明の方法が無リスクを示す場合には、計画されたとおりに治療を継続できる。

**【0082】**

本発明の方法がリスクを示す場合には、治療を改変することができる。好ましくは、治療は、本発明のマーカーのレベルを更に測定すること、および、例えば心電図検査、心エコーまたは当業者に公知の他の適当な方法により更に診断することを伴う。さらに、治療の改変には、塩分摂取の制限、定期的な適度な運動、非ステロイド系抗炎症薬の回避、インフルエンザおよび肺炎球菌に対する免疫化の提供、外科的治療（例えば、血管再生、バルーン拡張術、ステント留置法、バイパス手術）、薬物、例えば利尿剤（2種類以上の利尿薬の共投与を含む）、ACE（アンジオテンシン変換酵素）インヒビター、 $\beta$ アドレナリン遮断剤、アルドステロン拮抗薬、カルシウム拮抗薬（カルシウムチャネル遮断剤）、アンジオテンシン受容体遮断剤、ジギタリスなどの投与、のような手段、ならびに当業者により適切であるとみなされている公知の他のあらゆる手段が含まれる。

**【0083】**

本発明の方法により、心臓血管合併症が心疾患であると示された場合には、治療の焦点は心臓治療、特に、ACEインヒビターおよび $\beta$ アドレナリン遮断剤の投与となる。また、心臓毒性薬の投与および血液容量の増加を回避することが望ましい。また、血管再生療法（例えば、PCTI（経皮治療的介入）、バルーン拡張術、ステント留置法、バイパス手術）も検討されうる。

**【0084】**

ACEインヒビターは当業者に公知である。具体例には、ベナゼプリル、カプトプリル、シラザブリル、エナラブリル、フォシノブリル、リシノブリル、モエキシブリル、ペリンドブリル、キナブリル、ラミブリル、スピラブリルおよびトランドラブリルが含まれる。

**【0085】**

ACEインヒビターはまた、糖尿病性腎症の進行を遅らせうる。

**【0086】**

$\beta$ アドレナリン遮断剤（非選択性および $\beta_1$ 選択性）は当業者に公知である。具体例には、アセブトロール、アルプレノロール、アテノロール、ベタキソロール、ビソプロロール、ブプラノロール、カラゾロール、カルテオロール、カルベジロール、セリプロロール、メチプラノロール、メトプロロール、ナドロール、ネビボロール、オクスピレノロール、ベンブトロール、ビンドロール、プロバノロール、ソタロール、タニロロールおよびチモロールが含まれる。

**【0087】**

この場合の「心臓毒性薬の投与」は、特に、血液容量の増加を招きうる薬物、例えばチアゾリジンドン、例えばグリタゾン、メジオン、ピオグリタゾン、ロシグリタゾン、トログリタゾンの投与を意味する。

**【0088】**

本発明の方法により、心臓血管合併症が細小血管症であると示された場合には、治療の焦点は「脂質低下」薬（例えば、スタチン）および／または抗炎症薬の投薬となる。また血小板糖タンパク質IIb/IIIa受容体のインヒビターまたはアンタゴニストの投与も検討されうる。

【0089】

脂質低下薬は当業者に公知である。具体例には、フィブラーート（例えば、ベンゾフィブラーート、クロフィブラーート、エトフィブラーート、エトフィリン、クロフィブラーート、フェノフィブラーート、ジェムフィブロジル）、ニコチニ酸およびその類似体（例えば、ニコチニ酸、アシピモクス）、スタチン（例えば、シンバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、セリバスタチン）、陰イオン交換樹脂（例えば、コレステラミン、コレステポール）、プロポコールおよびシトステロールが含まれる。この場合の好ましい脂質低下薬はスタチンである。

【0090】

いくつかの脂質低下薬、特にスタチンは、抗炎症作用をも示し、このことは、それらの脂質低下薬を、細小血管症または血小板活性化の治療に更に適したものとすることに注目することが重要である。

【0091】

血小板糖タンパク質IIb/IIIa受容体のインヒビターまたはアンタゴニストは当業者に公知である。具体例には、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、チロフィバン、エプチフィバチドなどが含まれる。本発明の好ましい実施形態においては、糖タンパク質IIb/IIIa受容体インヒビターは抗体、特に、アブシキシマブの名称で知られている抗体である。アブシキシマブは、Centocor Europe BVからReoProの名称で入手可能なFabフラグメント抗体である。

【0092】

本発明の方法により、心臓血管合併症が血小板活性化であると示された場合には、治療の焦点は血小板凝集インヒビターおよび脂質低下薬（例えば、スタチン）の投与となる。

【0093】

血小板凝集インヒビターは当業者に公知であり、血小板の凝集を抑制しうるあらゆる薬物が含まれる。具体例としては、シクロオキシゲナーゼのインヒビター、特にCOX-1（例えば、アセチルサリチル酸）；ADPインヒビター（これは、アデノシンリン酸が、血小板上のその受容体に結合することを抑制する；例えば、チクロビジンまたはクロピドグレル）；血小板糖タンパク質IIb/IIIa受容体のインヒビターまたはアンタゴニスト（前記を参照されたい）；ジピリダモール；スルフィンピラゾン；デキストラン40が挙げられる。

【0094】

本発明の方法により、血糖値が十分には抑制されていないと示された場合には、当技術分野で公知であり適切であるとみなされている任意の血糖抑制方法により患者を治療する。

【0095】

具体例には、標的組織が血液から糖を取り込むを増強する薬物の投与、または腎β細胞からのインスリンの放出を刺激する薬物の投与が含まれる。そのようなよく知られた薬物の具体例には、インスリンおよびチアゾリジン系薬剤が含まれる。

【0096】

前記のとおり、糖尿病は種々の形態で発現しうる。発現とは、該疾患が、特定の合併症または特徴、例えば心臓血管合併症、心疾患、細小血管症、血小板活性化、炎症、または血糖値の不十分な抑制により明白となることを意味する。個体間の相違、例えば遺伝的相違、生活習慣（例えば、飲酒癖または喫煙癖、運動不足）の相違または病歴の相違により、糖尿病は、各患者において異なる合併症または特徴により発現しうる。例えば、ある特定の患者は細小血管症または糖尿病性腎症に罹患しうるが、別の患者は心疾患に罹患する。もう1つの例としては、患者が糖尿病に長期的に罹患していないために、血糖値が十分には抑制されていない患者であっても細小血管症には罹患しないかもしれない。一方、糖

尿病を長年患っている患者は、その血糖値が比較的良好に抑制されていたとしても、細小血管症に罹患しうる。

【0097】

したがって、本発明の方法は、心臓血管合併症、心疾患、細小血管症、血小板活性化、炎症および血糖値の不十分な抑制よりなる群に属する糖尿病の発現、特に顕著な発現、の診断を可能にする。

【0098】

前記から、本発明がまた、以下の方法に関するものであることは明らかである。患者における糖尿病の発現（特に、顕著な発現）を判定するための方法であって、

- a) 好ましくはin vitroにおいて、患者由来のサンプル中の少なくとも1つの血管新生マーカーまたはその変異体のレベルを測定し、
- b) 好ましくは追加的に、患者由来のサンプル中の少なくとも1つの心臓ホルモンまたはその変異体のレベルを測定し、
- c) 好ましくは追加的に、患者由来のサンプル中の、血小板活性化に関する少なくとも1つのマーカーまたはその変異体のレベルを測定し、
- d) 好ましくは追加的に、患者由来のサンプル中のCRP、hsCRP、IL-6またはそれらの変異体よりなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーのレベルを測定し、
- e) 好ましくは追加的に、患者由来のサンプル中のグルコース、HbA1c、CMLおよびAGEよりなる群から選ばれる少なくとも1つのマーカーのレベルを測定し、
- f) 該発現に関連している既知レベルと測定レベルとを比較することにより、該発現を診断するステップを含んでなり、ここで、
- g) ステップa)～c) のマーカーのレベルは、該発現が心臓血管合併症である、または心臓血管合併症に罹患するリスクを有することを示し、
- h) ステップa) のマーカーのレベルは、該発現が細小血管症である、または細小血管症に罹患するリスクを有することを示し、
- i) ステップb) のマーカーのレベルは、該発現が心疾患である、または心疾患に罹患するリスクを有することを示し、
- k) ステップc) のマーカーのレベルは、該発現が血小板活性化である、または血小板活性化に罹患するリスクを有することを示し、
- l) ステップd) のマーカーのレベルは、該発現が炎症である、または炎症に罹患するリスクを有することを示し、
- m) ステップe) のマーカーのレベルは、該発現が血糖値の不十分な抑制であることを示すことを特徴とする方法。

【0099】

前記のとおり、ステップa) のマーカーのレベルは更に、該発現が糖尿病性腎症、糖尿病性網膜損傷、四肢の低酸素症である、または糖尿病性腎症、糖尿病性網膜損傷、四肢の低酸素症に罹患するリスクを有することを示す。

【0100】

また前記のとおり、ステップc) のマーカーのレベルは更に、該発現が血小板凝集、血栓形成、血栓増殖、既に不安定になっているplaquesが破壊されるリスク、UAP、AMIである、または血小板凝集、血栓形成、血栓増殖、既に不安定になっているplaquesが破壊されるリスク、UAPもしくはAMIに罹患するリスクを有することを示す。

【0101】

前記方法の好ましいステップb) ～e) で測定する追加的なマーカーの数が多ければ多いほど、判定は改善される。

【0102】

本発明は、診断方法だけではなく、診断のための、本発明によつマーカーの使用に関する。

【0103】

本発明の診断は、好ましくは、診断手段の使用により行う。診断手段とは、対象となる物質、特に、対象となるペプチドまたはポリペプチドのレベル、量または濃度の測定を可能にするあらゆる手段である。

【0104】

本発明における対象となるペプチドまたはポリペプチドは、本明細書に記載の生化学的マーカーである。

【0105】

それぞれのペプチドのレベルを測定するために使用しうる方法および診断手段は当業者に公知である。これらの方法には、マイクロプレートELISAに基づく方法、完全自動化またはロボット化イムノアッセイ（例えば、Elecsys（商標）アナライザー上で利用可能）、CBA（酵素的コバルト結合アッセイ（Cobalt Binding Assay）；例えば、Roche-Hitachi（商標）アナライザー上で利用可能）およびラテックス凝集アッセイ（例えば、Roche-Hitachi（商標）アナライザー上で利用可能）が含まれる。

【0106】

さらに、ペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定するための種々の方法が当業者によく知られている。「レベル」なる語は、患者における又は患者から採取したサンプル中のペプチドまたはポリペプチドの量または濃度を意味する。

【0107】

本発明における「測定」なる語は、好ましくは半定量的または定量的に、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたは対象となる他の物質の量または濃度を決定することを意味する。測定は直接的または間接的に行うことが可能である。間接的な測定には、細胞応答、結合リガンド、標識または酵素反応産物の測定が含まれる。

【0108】

本発明において、量は濃度をも意味する。既知サイズのサンプル中の対象となる物質の総量から、その物質の濃度を計算することが可能であり、その逆も可能であることは明らかである。

【0109】

測定は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば細胞アッセイ、酵素アッセイ、またはリガンドの結合に基づくアッセイにより行うことが可能である。好ましい方法を以下に説明する。

【0110】

もう1つの好ましい実施形態においては、対象となるペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定するための方法は、(a) ペプチドまたはポリペプチドを、適当な基質と、適当な時間にわたり接触させ、(b) 産物の量を測定するステップを含む。

【0111】

もう1つの好ましい実施形態においては、対象となるペプチドまたはポリペプチドのレベルを測定するための方法は、(a) ペプチドまたはポリペプチドを、特異的に結合するリガンドと接触させ、(b) (所望により) 非結合リガンドを除去し、(c) 結合リガンドの量を測定するステップを含む。

【0112】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドはサンプル中、特に、体液または組織サンプル中に含有されており、そのサンプル中のペプチドまたはポリペプチドの量を測定する。

【0113】

ペプチドおよびポリペプチド（タンパク質）は、組織、細胞および体液サンプル中で、すなわち、好ましくはin vitroで測定されうる。好ましくは、対象となるペプチドまたはポリペプチドは体液サンプル中で測定される。

【0114】

本発明の組織サンプルは、死亡している又は生きているヒトまたは動物の身体から得られるあらゆる種類の組織を意味する。組織サンプルは、当業者に公知の任意の方法、例えば生検法または搔爬術により得ることが可能である。

**【0115】**

本発明における体液には、血液、血清、血漿、リンパ液、脳液、唾液、硝子体液および尿が含まれる。特に、体液には、血液、血清、血漿および尿が含まれる。体液のサンプルは、当業者に公知の任意の方法により得ることが可能である。

**【0116】**

好ましくは、サンプルは血液、血清または血漿である。

**【0117】**

必要に応じて、サンプルを更に処理することが可能である。特に、核酸、ペプチドまたはポリペプチドを、沪過、遠心分離または抽出法（例えば、クロロホルム／フェノール抽出）を含む当業者に公知の方法で精製することが可能である。

**【0118】**

他の好ましい測定方法は、対象となるペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合するリガンドの量を測定することを含みうる。本発明における結合は共有結合および非共有結合の両方を含む。

**【0119】**

本発明におけるリガンドは、任意のペプチド、ポリペプチド、核酸、または対象となるペプチドもしくはポリペプチドに結合する他の物質でありうる。ペプチドまたはポリペプチドを、ヒトまたは動物の身体から入手または精製する場合、それらは例えばグリコシリ化などにより修飾されている可能性があることが知られている。本発明における適当なリガンドは、そのような部位を介して該ペプチドまたはポリペプチドに結合することも可能である。

**【0120】**

好ましくは、リガンドは、測定するペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合すべきである。本発明における「特異的結合」は、リガンドが、被検サンプル中に存在する別のペプチド、ポリペプチドまたは物質に実質的に結合（「交差反応」）しないことを意味する。好ましくは、特異的に結合されたタンパク質またはアイソフォームは、他のいずれの関連ペプチドまたはポリペプチドより少なくとも3倍高い、より好ましくは少なくとも10倍高い、より一層好ましくは少なくとも50倍高い親和性で結合すべきである。

**【0121】**

非特異的結合が許容されることもある。それは、特に、試験したペプチドまたはポリペプチドを、例えば、そのサイズに応じた分離（例えば、電気泳動）により又はサンプル中のその相対的に多い存在量により、尚も区別できかつ明確に測定できる場合である。

**【0122】**

リガンドの結合は、当技術分野で公知の任意の方法により測定することが可能である。好ましくは、その方法は半定量的または定量的である。適当な方法を以下に説明する。

**【0123】**

第1に、リガンドの結合を、例えばNMRまたは表面プラズモン共鳴により、直接測定することが可能である。

**【0124】**

第2に、リガンドが、対象となるペプチドまたはポリペプチドの酵素活性の基質としても機能する場合には、酵素反応産物を測定することが可能である（例えば、切断された基質の量を例えばウエスタンプロット上で測定することにより、プロテアーゼの量を測定することが可能である）。

**【0125】**

酵素反応産物の測定の場合には、好ましくは、基質の量を飽和にしておく。反応の前に、検出可能な標識で基質を標識することも可能である。好ましくは、適当な時間にわたり、サンプルを基質と接触させる。適当な時間は、検出可能な、好ましくは測定可能な量の産物が産生されるのに必要な時間を意味する。産物の量を測定する代わりに、所定の（例えば、検出可能な）量の産物の出現に必要な時間を測定することが可能である。

**【0126】**

第3に、リガンドを、該リガンドの検出および測定を可能にする標識に共有的または非共的に結合させることが可能である。

【0127】

標識化は直接または間接的な方法により行うことが可能である。直接的な標識化は、リガンドに標識を直接的に結合（共有結合または非共有結合）させることを含む。間接的な標識化は、一次リガンドに二次リガンドを結合（共有結合または非共有結合）させることを含む。二次リガンドは一次リガンドに特異的に結合すべきである。二次リガンドは、適当な標識に結合しており、および／または、二次リガンドに結合する三次リガンドの標的（受容体）でありうる。シグナルを増強するために、二次、三次または更に高次のリガンドがしばしば使用される。適当な二次およびより高次のリガンドには、抗体、二次抗体、および広く知られたストレプトアビシン-ビオチン系（Vector Laboratories, Inc.）が含まれうる。

【0128】

リガンドまたは基質を、当技術分野で公知の1以上のタグで「タグ付け」することも可能である。ついでそのようなタグは、より高次のリガンドの標的となりうる。適当なタグには、ビオチン、ジゴキシゲニン、Hisタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG、GFP、myc-タグ、インフルエンザAウイルス血球凝集素（HA）、マルトース結合タンパク質などが含まれる。ペプチドまたはポリペプチドの場合には、タグは、好ましくは、N末端および／またはC末端に位置する。

【0129】

適当な標識は、適当な検出方法により検出可能な任意の標識である。典型的な標識には、金粒子、ラテックスビーズ、アクリジンエステル、ルミノール、ルテニウム、酵素的に活性な標識、放射能標識、磁気標識（例えば、常磁性および超常磁性標識を含む磁気ビーズ）および蛍光標識が含まれる。

【0130】

酵素的に活性な標識には、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、βガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよびそれらの誘導体が含まれる。検出のための適当な基質には、ジ-アミノ-ベンジジン（DAB）、3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン、NBT-BCIP（4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリドおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート；既に調製されているストック溶液としてRoche Diagnosticsから入手可能）、CDP-Star（商標）（Amersham Biosciences）、ECF（商標）（Amersham Biosciences）が含まれる。適当な酵素-基質の組合せは着色反応産物、蛍光または化学発光を与えることが可能であり、これらは、当技術分野で公知の方法（例えば、感光性フィルムまたは適当なカメラシステムを使用すること）により測定することができる。酵素反応の測定の場合と同様に、前記の基準が同様に適用される。

【0131】

典型的な蛍光標識には、蛍光タンパク質（例えば、GFPおよびその誘導体）、Cy3、Cy5、テキサスレッド、フルオレセインおよびアレクサ（Alexa）色素（例えば、アレクサ568）が含まれる。他の蛍光標識は例えばMolecular Probes（Oregon）から入手可能である。蛍光標識としての量子ドットの使用も意図される。

【0132】

典型的な放射能標識には、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>Pなどが含まれる。放射能標識は、任意の適当な公知方法（例えば、感光性フィルムまたはホスホリイメージヤー）により検出することが可能である。

【0133】

本発明の適当な測定方法には、沈降（特に、免疫沈降）、電気化学発光（電気的に生成する化学発光）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、ELISA（酵素結合イムノソルベントアッセイ）、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ（ECLIA）、解離増強ランタニド蛍光イムノアッセイ（DELFIA）、シンチレーション近接アッセイ（SPA）、比濁分析法、ネフェロメトリー、ラテックス増強比濁分析法またはネフェロメ

トリー、固相免疫試験、および質量分析、例えばSELDI-TOF、MALDI-TOFまたはキャビラリーエレクトロフィルム-質量分析(CE-MS)が含まれる。当技術分野で公知の他の方法(例えば、ゲル電気泳動、2Dゲル電気泳動、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、ウエスタンプロット法)は、単独で又は標識化もしくは前記の他の検出方法と組合せて用いることが可能である。

【0134】

好ましいリガンドには、抗体、核酸、ペプチドまたはポリペプチド、およびアプタマー(aplamer)、例えば核酸またはペプチドアプタマーが含まれる。そのようなリガンドに関する方法は当技術分野でよく知られている。例えば、適当な抗体またはアプタマーの同定および製造は業者が行っている。より高い親和性または特異性を有するそのようなリガンドの誘導体を開発するための方法は当業者によく知られている。例えば、ランダム突然変異を核酸、ペプチドまたはポリペプチド内に導入することが可能である。ついでこれらの誘導体を、当技術分野で公知のスクリーニング法(例えば、ファージディスプレイ)に従い、結合に関して試験することが可能である。

【0135】

本明細書中で用いる「抗体」なる語には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびにそれらのフラグメント、例えば、抗原またはハプテンに結合しうるFv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントが含まれる。

【0136】

もう1つの実施形態においては、好ましくは、核酸、ペプチド、ポリペプチドよりなる群、より好ましくは、核酸、抗体またはアプタマーよりなる群から選ばれるリガンドがアレイ上に存在する。

【0137】

このアレイは、対象となるペプチド、ポリペプチドまたは核酸に対するものでありうる少なくとも1つの追加的なりガンドを含有する。その追加的なりガンドは、本発明において特に関心のないペプチド、ポリペプチドまたは核酸に対するものであってもよい。好ましくは、本発明において対象となるペプチドまたはポリペプチドに対する少なくとも3種、好ましくは少なくとも5種、より好ましくは少なくとも8種のリガンドが該アレイ上に含有されている。

【0138】

本発明においては、「アレイ」なる語は、少なくとも2つの化合物が一次元、二次元または三次元の配置で付着または結合している固相またはゲル様担体を意味する。そのようなアレイ(「遺伝子チップ」、「タンパク質チップ」、抗体アレイなどが含まれる)は当業者に一般に公知であり、典型的には、ガラス顕微鏡スライド、特別にコーティングされたガラススライド(例えば、ポリカチオニ-、ニトロセルロース-またはビオチンがコーティングされたスライド)、カバーガラス、および膜(例えば、ニトロセルロース系またはナイロン系の膜)上に作製される。

【0139】

アレイは結合リガンドまたは少なくとも2つの細胞(それぞれは少なくとも1つのリガンドを発現する)を含みうる。

【0140】

また、本発明におけるアレイとして「懸濁アレイ」を使用することも意図される(Nolan JP, Sklar LA. (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1):9-12)。そのような懸濁アレイにおいては、担体、例えばマイクロビーズまたはミクロスフェアが懸濁状態で存在する。アレイは、おそらくは標識された、種々のリガンドを担持する種々のマイクロビーズまたはミクロスフェアよりなる。

【0141】

本発明は更に、少なくとも1つのリガンドを他のリガンドと共に担体材料に結合させる、前記に定義したアレイの製造方法に関する。

**【0142】**

そのようなアレイの製造方法、例えば、固相化学および光不安定性保護基に基づく製造方法は、一般に公知である（米国特許第5,744,305号）。また、そのようなアレイを物質または物質ライブラリーと接触させ、相互作用に関して、例えば、結合またはコンホメーション変化に関して試験することが可能である。したがって、ペプチドまたはポリペプチドに特異的に結合するリガンドを同定するために、前記に定義したペプチドまたはポリペプチドを含むアレイを使用することができる。

**【実施例】****【0143】**実施例1研究計画

Steno-2研究の研究計画および主要結果は既に詳細に報告されている（Gaede, P., Vede, P., Larsen, N. ら(2003). Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. New England Journal of Medicine, vol. 348 (5), pp. 383-93）。簡潔に説明すると、160名の微小アルブミン尿性2型糖尿病患者を、いくつかの付随的リスク因子を標的とする通常の治療（n=80）または集中的な多因子治療にランダム化した。集中治療群の患者は、グリコシル化ヘモグロビン値を6.5%未満に、血圧を130/80mm Hg未満に、空腹時血清総コレステロールレベルを175mg/dl未満に、および空腹時血清トリグリセリドレベルを150mg/dl未満に維持することを意図した生活習慣および薬理学的介入の段階的導入で治療した。推奨される生活習慣介入は、食事脂肪摂取の低減、軽い又は適度な運動への定期的な参加、および禁煙を含むものであった。集中治療群のすべての参加者にはまた、血圧レベルとは無関係に、低用量のアスピリンおよびアンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビターを服用するよう勧めた。平均追跡期間は7.8年であった。研究期間の全体にわたり、集中治療群では、HbA1c値、総コレステロール、LDL-コレステロールおよびトリグリセリドの空腹時血清レベル、収縮期および拡張期血圧ならびに尿アルブミン排泄量が著しく低かった（Gaede, 前掲）。これらの変化は、大血管症および細小血管症のリスクの顕著な減少と関連していた（相対リスク減少は心臓血管疾患では53%、腎症への進行では61%、網膜症の進行では58%、および自律神経障害の進行では63%）（Gaede, 前掲）。

**【0144】**

160名の全参加患者は1992～93年にSteno Diabetes Centerから集められた。微小アルブミン尿症は、6個中4個の24時間尿サンプルにおいて30～300mg/24hの尿アルブミン排泄量（AER）として定義された。糖尿病は1985年のWHOの基準により定義された。排除基準は、65歳を超えるまたは40歳未満の年齢；1mgのグルカゴンの静脈内注射の6分後の刺激された血清C-ペプチド濃度600pmol/l未満；腎不全または腎炎による二次性糖尿病；飲酒癖；非糖尿病性腎疾患；悪性疾患；または4年以内に死亡する可能性のある生命を脅かす疾患であった。すべての参加者からインフォームドコンセントを得た。プロトコールは、ヘルシンキ宣言に従うものであり、コペンハーゲン・カウンティ（Copenhagen County）の倫理委員会により承認されたものであった。

**【0145】**

この事後分析において、ベースライン血漿NT-proBNPが集団の中央値より低いか又は高いかによって、患者を2つの群に層別化した。

**【0146】**エンドポイント

この研究における一次エンドポイントは、心臓血管疾患による死亡、非致命的心筋梗塞、非致命的卒中、経皮的冠状介入、冠状動脈バイパス移植、血管手術および切断術を含む心臓血管疾患に関する混合エンドポイントであった。心臓血管疾患による死亡およびうつ血性心不全による入院を含む二次エンドポイントも調べた。

**【0147】**アッセイ

全血液サンプルは一晩の絶食後の0800時に採取した。患者は採血当日の朝には薬を服用しなかった。

#### 【0148】

患者を少なくとも20分間、仰向けにして安静にさせた後、血漿NT-proBNPの分析のための血液サンプルを集め、遠心分離し、分析するまで血漿を-80°Cで保存した。NT-proBNPの血漿中濃度をElecsys 2010 (Roche Diagnostics, Germany) 上でのサンドイッヂイムノアッセイにより測定した。プールしたヒト血漿サンプルにおいて分析範囲は5~35 000pg/mlに及び、全変動係数は<0.061である。pg/mlをpmol/lに変換するためには、0.118を掛け算する。ベースライン時ならびに2年、4年および8年の追跡調査後に血液サンプルを採取した。

#### 【0149】

##### 統計

ベースラインにおける2群の比較は、数値変数に適している場合には常に、一元配置分散分析またはマン-ホイットニー(Mann-Whitney)の検定により行った。カテゴリ変数を比較するためには、 $\chi^2$ 検定またはフィッシャーの直接法を用いた。

#### 【0150】

元々の2つの治療群は心臓血管疾患に関するリスクにおいて有意に異なっていたため、これらの群においてそれぞれ別々に、中央値より低い又は高い群および混合群に関するカットオフ値としてそれぞれの元の治療群における中央値を用いて、心臓血管疾患に関するリスクマーカーとしての血漿NT-proBNPの役割を分析した。

#### 【0151】

一次および二次エンドポイントの最初のイベントまでの時間に関するイベント曲線はカプラン-マイヤー(Kaplan-Meier)分析に基づくものであった。それらの2つの群を、ログランク検定を用いて比較した。95%信頼区間を伴うハザード比を、Cox回帰モデルを用いて算出した。結果は、未調整の結果と、2型糖尿病患者における心臓血管疾患に関するリスク因子についての調整を伴う以下の2つのモデルの結果との両方を示した。モデル1は、既知糖尿病罹患期間、ベースラインにおける既知心臓血管疾患、既に報告されている性別および年齢に関する調整を伴う。モデル2は、収縮期および拡張期血圧、グリコシル化ヘモグロビンA1c、空腹時血清総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、トリグリセリドおよび尿アルブミン排泄量に関する更なる調整を伴う。また、混合集団に関する結果も、元の治療配分に関して調整した。この2つの治療群のそれぞれにおける血漿NT-proBNPレベルの経時変化をウィルコクソン検定で比較した。

#### 【0152】

##### 結果

ベースラインにおける空腹時血漿NT-proBNPレベルは、全steno-2集団においては5(検出可能な最小値)~1290pg/ml(中央値は33.5pg/ml)であり、一方、元の集中治療群における値は5~1290(中央値は35.3)pg/mlであり、通常の治療群における値は5~1134(中央値32.0)pg/mlであった。それらの2つの群のベースライン特性を表1に示す。高いベースライン血漿NT-proBNPレベルは、より長い糖尿病罹患期間、より高い年齢、より高い収縮期血圧および腎臓機能障害に関連していた。同様に、中央値より高い群の、より高い割合の患者を、ベースラインにおいてカルシウム拮抗薬で治療した(表1)。

【表1】

全集団における中央値より低い又は高いベースライン血漿N末端proBNPレベルによる160名の2型糖尿病患者のベースライン特性

	中央値より低い群 N=80	中央値より高い群 N=80	p-値
HbA1c (%) *†	8.7 (0.2)	8.4 (0.2)	0.29
収縮期血圧 (mm Hg) *†	143 (1.9)	153 (2.2)	0.002
拡張期血圧 (mm Hg) *†	86 (1.0)	85 (1.3)	0.39
空腹時血清総コレステロール (mg/dl) *†	224 (4)	209 (4)	0.048
空腹時血清HDL-コレステロール (mg/dl) *†	40 (1)	39 (1)	0.62
空腹時血清トリグリセリド (mg/dl) *†	186 (62 - 992)	168 (44 - 1993)	0.09
既知糖尿病罹患期間 (年) *†	5 (0 - 26)	7 (0 - 30)	0.003
性別 (n)	59 ♂ / 21 ♀	60 ♂ / 20 ♀	0.96
喫煙者 (n)	28	32	0.55
血清クレアチニン ( $\mu\text{mol/l}$ ) *†	74 (1.5)	80 (2.1)	0.015
体重 (kg) *†	92.8 (1.7)	89.1 (1.8)	0.13
糸球体濾過値 (ml/分/ $1.73\text{ m}^2$ ) *†	125 (2.4)	109 (2.8)	<0.0001
既知心臓血管疾患 (n)	7	14	0.11
左心室質量指数*	110 (2.9)	126 (4.2)	0.001
年齢 (歳) *†	52 (0.8)	58 (0.7)	<0.0001
NT-proBNP (pg/ml) *†	13.0 (<5 - 32.8)	69.7 (33.5 - 1290)	<0.0001
尿アルブミン排泄 (mg/24h) *†	70 (32 - 286)	80 (33 - 265)	0.11
尿ナトリウム排泄 ( $\text{mmol}/24\text{h}$ ) *†	213 (46 - 577)	176 (25 - 449)	0.19
投薬			
ACEインヒビター (n)	13	18	0.42
利尿剤 (n)	14	25	0.07
$\beta$ 遮断剤 (n)	4	5	1.00
カルシウム遮断剤 (n)	3	13	0.02
治療配分	集中 41	集中 39	0.69

\* 平均 (SE), † 中央値 (範囲)

【0153】

コレステロール値を $\text{mmol/l}$ に変換するためには、0.02586を掛け算する。トリグリセリド値を $\text{mmol/l}$ に変換するためには、0.01129を掛け算する。NT-proBNP値を $\text{pmol/l}$ に変換するためには、0.118を掛け算する。

## 【0154】

7.8年間の平均追跡期間中、中央値より低い血漿NT-proBNPの群においては12の主要心臓血管イベントが認められ、一方、中央値より高い群においては54のイベントが認められた( $p<0.0001$ )（図1）。同様に、表1に示すとおり、steno-2研究における2つの元の治療群のそれぞれにおいても、心臓血管疾患と血漿NT-proBNPレベルとの間に有意な相関性が認められた。2型糖尿病における心臓血管疾患のリスク因子に関する調整は、いずれの調整モデルにおいても、相関性の有意性を変化させなかった（表2）。表2は、中央値より低い血漿レベルを有する患者の場合と比較して中央値より高い血漿NT-proBNPレベルを有する（パネルA）、または125pg/mlのカットオフレベルを用いた（パネルB）、2型糖尿病患者における一次および二次エンドポイントに関するハザード比（95% CI）を示す。モデル1は、ベースラインにおける既知心臓血管疾患、既知糖尿病罹患期間、年齢および性別に関して調整されている。モデル2は、モデル1における変数の調整に加えて、収縮期および拡張期血圧、グリコシル化ヘモグロビンA1c、空腹時血清脂質および尿アルブミン排泄量に関して調整されている。

【表2】

パネルA	集中群	通常群	混合群
<u>一次エンドポイント</u>			
<u>上</u>			
未調整	6.1 (1.8 - 20.9) p=0.004	3.1 (1.5 - 6.5) p=0.002	4.4 (2.3 - 8.4) p<0.0001
モデル1	4.7 (1.2 - 17.7) p=0.022	2.3 (1.0 - 5.0) p=0.038	3.3 (1.7 - 6.5) p=0.001
モデル2	4.1 (1.0 - 16.7) p=0.048	3.0 (1.2 - 7.6) p=0.021	3.6 (1.7 - 7.5) p=0.001
<u>二次エンドポイント</u>			
<u>上</u>			
未調整	7.3 (0.9 - 59.3) p=0.06	3.3 (1.1 - 10.2) p=0.036	5.8 (2.0 - 16.9) p=0.001
モデル1	4.4 (0.4 - 48.2) p=0.23	3.3 (0.9 - 12.3) p=0.08	4.4 (1.3 - 14.3) p=0.015
モデル2	3.0 (0.3 - 32.7) p=0.38	5.2 (1.0 - 26.1) p=0.044	8.4 (2.0 - 36.3) p=0.004
パネルB	集中群	通常群	混合群
<u>一次エンドポイント</u>			
<u>上</u>			
未調整	6.0 (2.3 - 15.3) p=0.0002	3.4 (1.8 - 8.0) p=0.001	4.7 (2.6 - 8.4) p<0.0001
モデル1	5.7 (2.0 - 16.3) p=0.001	2.4 (1.0 - 5.6) p=0.048	3.0 (1.6 - 5.7) p=0.001
モデル2	7.1 (1.9 - 27.1) p=0.004	2.9 (1.0 - 8.6) p=0.047	3.3 (1.7 - 6.7) p=0.001
<u>二次エンドポイント</u>			
<u>上</u>			
未調整	8.7 (2.2 - 34.9) p=0.002	4.1 (1.5 - 11.2) p=0.007	5.3 (2.4 - 12.0) p<0.0001
モデル1	7.4 (1.5 - 37.2) p=0.015	2.9 (0.9 - 9.4) p=0.08	3.4 (1.4 - 8.2) p=0.006
モデル2	15.1 (1.0 - 238.0) p=0.054	2.4 (0.6 - 10.0) p=0.24	4.5 (1.5 - 13.5) p=0.007

## 【0155】

また、二次エンドポイントに関するハザード比は、古典的リスク因子に関して未調整のもの及び調整されたものの両方において、血漿NT-proBNPのベースラインレベルと有意に相関していた（表2）。しかし、元の2つの治療群のそれぞれにおいて分析したとき、同様の大きさのハザード比が認められたものの、調整はリスクマーカーとしての血漿NT-proBNPの重要性を低下させた（表2）。

## 【0156】

125pg/mlの血漿NT-proBNPカットオフレベルを適用した場合には、一次および二次エンドポイントに関するリスクの有意性およびサイズは、この集団において、より低いカットオフレベルと比較して、実質的に変化しなかった（表2）。

## 【0157】

研究開始の2年後に測定したところ、混合集団においては血漿NT-proBNPレベルが有意に増加し（14.9pg/ml, p<0.0001）、集中および通常治療群においても同様の結果が認められた（11.7pg/ml, p=0.001および18.2pg/ml, p<0.0001）。図3に示すとおり、追跡期間中、中央値血漿NT-proBNPレベルは、中央値より低い群および高い群の両方において増加し続けた。元の集中治療群および通常治療群を別々に分析した場合にも、これと同様のこととが認められた。

#### 【0158】

介入の最初の2年間における血漿NT-proBNPの変化は、残りの追跡期間における心臓血管イベントに関するリスクと有意に相関していた。混合集団における血漿NT-proBNPレベルの10pg/mlの減少は、一次および二次エンドポイントに関して、集中、通常および混合集団のすべてにおける有意な1%の相対リスク減少に関連していた（すべての場合にp<0.001）。最初の2年間の追跡調査の間に合計42名の患者において血漿NT-proBNPレベルが低下し、中央値減少は12pg/mlであった。中央値より高いベースライン分類からの18名の患者は、2年間の介入の後、中央値より低いレベルを達成した。しかし、このレベルへの到達は、そのレベルに到達していない患者と比較して、心臓血管疾患に関するリスクの減少とは関連していなかった（ハザード比0.45（0.12-1.65, p=0.23）。

#### 【0159】

残りの追跡期間中の血漿NT-proBNPレベルと心臓血管疾患に関するリスクとの間の相関性は、一次エンドポイントおよび二次エンドポイントの両方に関して、2年後にも依然として有意であった。

#### 【0160】

steno-2研究からのこの事後分析において、本発明者らは、2型糖尿病および微小アルブミン尿症を有する患者における、心臓血管疾患に関する将来のリスクと血漿NT-proBNPレベルとの間だけでなく、心臓血管疾患による死亡およびうっ血性心不全による入院を含む二次エンドポイントに関しての将来のリスクと、血漿NT-proBNPレベルとの間にも有意かつ独立した相関性を実証した。

#### 【0161】

結論として、心臓血管疾患およびうっ血性心不全に関する強力なリスクマーカーとしての血漿NT-proBNPの役割が2型糖尿病患者に見出される。

#### 【0162】

#### 実施例2

##### 患者および研究計画

Steno Diabetes Centerの外来に通院しており、同じ年に糸球体済過値が測定されている、糖尿病性腎症を有するすべての1型糖尿病患者（n=242）を、1993年にケースコントロール研究に参加するよう招いた（Tarnow, L., Cambien, F., ら(1995). Insertion/deletion polymorphism in the angiotension-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. Diabetologia, vol. 38, pp. 798-803）。糖尿病性腎症に関する臨床基準（連続的な3回の24時間にわたる採尿のうちの少なくとも2回における持続的マクロアルブミン尿症（>300mg/24 h）、糖尿病性網膜症の存在、および他の腎臓または尿路疾患の非存在（Parving H-H, Osterby R, Ritz E. Diabetic nephropathy. In Brenner BM, 編. The Kidney, pp. 1777-818. Philadelphia: WB Saunders, 2003））を満たす合計199名の患者を登録した。長期にわたる1型糖尿病および持続的正常アルブミン尿を有する192名の患者群を対照として用いた。腎症を有する198名の患者および正常アルブミン尿を有する188名の患者において、血漿NT-proBNPを測定した。

#### 【0163】

今後の観察的研究計画においては、患者を2003年2月1日まで又は死亡（n=62）もしくは移住（n=3）時まで、追跡した。この研究は、ヘルシンキ宣言に従い地域倫理委員会により承認されたものであり、すべての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

**【0164】**ベースライン臨床・研究検査

一晩の絶食の後の午前中に検査を行った。腎症患者の24%および正常アルブミン尿の患者の88%については、これまで全く抗高血圧剤を処方しなかった。検査の8日前に、残りのすべての患者に、抗高血圧剤および利尿剤での治療を中止するよう求めた。しかし、すべての患者がそのようにすることを望んだわけではなく、したがって、腎症および正常アルブミン尿群の患者のそれぞれ34%および4%が検査当日に抗高血圧剤を服用していた。

**【0165】**

仰向けに少なくとも10分間安静にした後、適当なカフサイズで動脈血圧を2回測定した。酵素イムノアッセイ (Feldt-Rasmussen B, Dinesen B, Deckert M. Enzyme immunoassay: an improved determination of urinary albumin in diabetics with incipient nephropathy. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1985;45:539-44) により、24時間の採尿物から尿アルブミン濃度を測定した。動的Jaffe法により血清クレアチニン濃度を評価した。糖尿病性腎症患者については、3.7 MBq  $^{51}\text{Cr}$ -EDTAの1回の注射の後、該注射の180、200、220および240分後に採取した静脈血サンプル中の放射能の測定により、糸球体済過値を測定した。正常アルブミン尿患者については、腎臓病における食事の変更 (Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)) の式 (Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth Dら, A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Ann. Intern. Med. 1999;130:461-70) により糸球体済過値を推定した。糖尿病性網膜症を、すべての患者において、視神經乳頭拡張後の眼底撮影により評価し、無し、単純または増殖性網膜症として等級化した。WHO心臓血管アンケート用紙を使用して、患者に面接した。主要心臓血管イベントは卒中および／または心筋梗塞の病歴として診断した。喫煙者は、1日に1本以上のタバコ／葉巻／パイプを吸う者と定義し、残りのすべての者は非喫煙者として分類した。

**【0166】**NT-proBNPの測定

患者を少なくとも20分間、仰向けにして安静にさせた後、血漿NT-proBNPの測定のための血液サンプルを集め、遠心分離し、血漿を、分析するまで-80°Cで保存した。NT-proBNPの血漿中濃度をElecsys 2010 (Roche Diagnostics, Germany) でサンドイッチイムノアッセイにより測定した。アッセイ間の変動は3.0%未満であり、NT-proBNPの低および高範囲において全変動係数は2.2～5.8%である。

**【0167】**追跡調査

2003年夏に、国民名簿 (national register) によりすべての患者を追跡調査した。患者が2003年2月1日までに死亡した場合には、死亡日を記録し、死因に関する情報を死亡診断書から得た。すべての死亡診断書を2人の評者により別々に精査し、主死因を記録した。検死報告から入手可能な追加的な情報を加えた。明白な非心臓血管原因が確認されない限り、すべての死亡を心臓血管疾患による死亡として分類した (Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CP, Held P, McMurray JJV, Michelson EL らEffects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-overall programme. Lancet 2003;362:759-66)。

**【0168】**統計分析

正規分布変数は平均±SDとして与えられ、一方、非正規分布変数は対数変換され、中央値（範囲）として与えられる。群間比較は片側スチューデントt検定またはANOVAにより行った。不連続変数を比較するためには、 $\chi^2$ を使用した。NT-proBNPと腎症または主要心臓血管疾患の存在／非存在との間のベースラインにおける関係の分析を、性別、年齢、収縮期血圧および糸球体済過値に関して調整した。 $\leq 0.05$ の両側p値を統計的に有意とみなした。

**【0169】**

すべての時間対死亡変数をログランク検定により分析し、腎症の存在またはNT-proBNPレベルが中央値より高いか低いかに応じて、カプラン-マイラー（Kaplan-Meier）プロット上に示した。腎症を有する患者においては、共変数を調整したCox回帰モデルを以下の所定のベースライン共変数にフィットさせた：性別、年齢、糸球体沪過値、喫煙、主要心臓血管疾患歴、採血時に行っている抗高血圧剤の投薬、および中央値（110 ng/l）より高い又は低い $\log_{10}$  NT-proBNPまたはNT-proBNP。このモデルの過剰フィットを避けるために、更なる調整は行わなかった。結果は、予後に影響を及ぼしうる他の因子に関する調整を行わないで又は行って、95%信頼区間と共にハザード比として示されている。

## 【0170】

すべての計算は、市販のプログラム（SPSS for Windows, version 10.0）で行った。

## 【0171】

結果

糖尿病性腎症を有する及び有しない1型糖尿病患者は、性別、年齢および糖尿病罹患期間に関して厳密に一致させた。正常アルブミン尿の患者と比較して、糖尿病性腎症の患者は、高い血圧、高いHbA<sub>1c</sub>、高い血清コレステロールおよび低い糸球体沪過値を有していた（p<0.0001）。平均して、糖尿病性腎症患者においては糸球体沪過値は良く保存されていた（表3）。

## 【表3】

糖尿病性腎症を有する及び有しない 386 名の 1 型糖尿病患者のベースライン臨床・研究特性

	腎症 n = 198	正常アルブミン尿 N = 188	P 値
性別（男/女）	122 / 76	114 / 74	0.84
年齢（歳）	41.0 (9.5)	42.5 (9.9)	0.14
糖尿病罹患期間（年）	27.7 (8.0)	26.8 (8.5)	0.26
網膜症（無し/単純/増殖）	0 / 137 / 61	66 / 103 / 19	<0.001
心筋梗塞の病歴	10 (5.1 %)	2 (1.1 %)	0.036
卒中の病歴	14 (7.1 %)	1 (0.5 %)	0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.0 (3.3)	23.7 (2.5)	0.20
HbA <sub>1c</sub> (%)	9.6 (1.5)	8.5 (1.1)	<0.001
尿アルブミン排泄 (mg/24h)	794 (16 - 14 545)	8 (1-30)	-
血清クレアチニン (μmol/l)	103 (54-684)	76 (40-116)	<0.001
GFR (ml/分)	74 (33)	94 (16)	<0.001
収縮期血圧 (mmHg)	151 (23)	132 (18)	<0.001
拡張期血圧 (mmHg)	86 (13)	76 (10)	<0.001
サンプル採取時の抗高血圧薬 (%)	34 %	4 %	<0.001
血清コレステロール (mmol/l)	5.6 (1.2)	4.8 (1.0)	<0.001
血清HDL-コレステロール (mmol/l)	1.46 (0.54)	1.56 (0.53)	0.07
血清トリグリセリド (mmol/l)	1.22 (0.30 - 9.90)	0.77 (0.30 - 3.10)	<0.001
喫煙者 (%)	50 %	43 %	0.17

## 【0172】

データはn、平均（SD）、中央値（範囲）である。抗高血圧薬を服用している、既に持続的なアルブミン尿症を有する幾人かの患者は、<300mg/24 hの尿アルブミン排泄量を有していた。

## 【0173】

糖尿病性腎症を有する患者において、血漿NT-proBNP濃度は110（5 - 79640）ng/l（中央値（範囲））上昇し、一方、正常アルブミン尿の患者においては、27（5 - 455）ng/l上昇した（p<0.0001）。この相違は、糸球体沪過値および他の共変数の差異に関する調整後も維持された（p<0.0001）。NT-proBNP濃度は糖尿病性腎症の初期において上昇し（40

(5 - 3111) ng/1)、このとき、糸球体沪過値は尚も正常範囲 (>100ml/分) 内であった。

【0174】

腎症群において、NT-proBNPの血漿中濃度は1型糖尿病の男女間で有意差はなかったが (p=0.28) 、年齢 ( $r=0.42$ ,  $p<0.0001$ ) 、収縮期血圧 ( $r=0.53$ ,  $p<0.0001$ ) と共に増加し、糸球体沪過値 ( $r= -0.60$ ,  $p<0.0001$ ) およびヘモグロビン ( $r= -0.52$ ,  $p<0.0001$ ) と共に減少した。NT-proBNPと血糖、HbA<sub>1c</sub> または血清コレステロールのいずれとの相関性も観察されなかった。糖尿病性腎症とNT-proBNPとの間の関連性は見出されなかった。糖尿病性腎症患者のうち、サンプル採取時に抗高血圧剤を服用している患者については、循環NT-proBNP濃度がより高かったが、この相違は、糸球体沪過値に関する調整後には消失した。

【0175】

推定糸球体沪過値 (中央値92ml/分/1.73m<sup>2</sup> (範囲: 45~170)) と血漿NT-proBNP ( $r = -0.22$ ,  $p=0.002$ ) との間の弱い逆相関性が正常アルブミン尿の患者において示された。

【0176】

主要心臓血管イベントの罹患率は、糖尿病性腎症を有する患者と有しない患者との間で異なり、それぞれ、11% (95% CI: 8-14) および2% (0-4) であった ( $p<0.0001$ )。腎症患者においては、ベースラインにおける血漿NT-proBNPが、非致死性心筋梗塞および／または卒中の歴史を有する患者 (671 (34-12418) ng/1,  $p<0.0001$ ) において、主要心臓血管疾患の歴史を有しない患者 (97 (5-79640) ng/1) と比較して有意に高かった。考えられる交絡因子(confounder)に関する調整の後、NT-proBNPの10倍増加は主要心臓血管イベントのオッズ比を3.1 (95% CI 1.2-7.8,  $p=0.02$ ) 増加させた。

【0177】

追跡調査中、腎症を有する51名 (26%) の患者および腎症を有しない11名 (6%) の患者が死亡した ( $p<0.0001$ )。正常アルブミン尿群におけるイベントの数が少ないため、さらなる分析は、腎症を有する患者に限定される。腎症群において、血漿NT-proBNPの中央値は110ng/1であり、この値より高い値を有する39名 (39%) の患者およびこの値より低い値を有する12名 (12%) の患者が何らかの原因で死亡した。未調整ハザード比は3.86 (95% CI 2.02-7.37) ( $p<0.0001$ ) であり、共変数を調整したハザード比は2.28 (1.04-4.99) ( $p=0.04$ ) であった (図4)。この、より低い死亡率は、より少數の心臓血管死亡数 (中央値NT-proBNPレベルより高い場合および低い場合がそれぞれ31名 (31%) および7名 (7%) ) によるものであった (未調整ハザード比5.25 (2.31-11.92),  $p<0.0001$ ; 共変数調整ハザード比3.81 (1.46-9.94),  $p=0.006$ ) (図5)。すべての原因および心臓血管疾患による死亡率に対する血漿NT-proBNPの影響は、糸球体沪過値の差異について調整した後にも依然として有意であった。さらに、NT-proBNPと糸球体沪過値との間の相互作用は有意ではなく、したがってこのことは、死亡率および心臓血管疾患死亡率に対するNT-proBNP濃度の影響は糸球体沪過値のレベルには左右されないことを示している。血清コレステロールおよび収縮期血圧に関する更なる調整はハザード比を実質的に変化させず、結果は依然として有意であった。

【0178】

腎症および110ng/1より低い血漿NT-proBNPレベルを有する患者における全体的な (ログランク検定,  $p=0.06$ ) および心臓血管疾患 ( $p=0.07$ ) による死亡率は、正常アルブミン尿群とは統計的に異ならなかった (図2および3)。

【0179】

米国で推奨されている125ng/1 のNT-proBNPのカットオフ値を適用することにより、すべての原因の及び心臓血管疾患による死亡率に関する共変数調整ハザード比は僅かに変化したに過ぎなかった (それぞれ、2.68 (1.24-5.79),  $p=0.01$  および4.09 (1.61-10.41),  $p=0.003$ )。

【0180】

連続変数としてNT-proBNP濃度を含むCox回帰分析は、全ての原因による死亡率に関して NT-proBNPのそれぞれ10倍増加についての未調整ハザード比が、3.39 (2.38-4.82) ( $p<0.001$ ) であり、共変数調整ハザード比が2.67 (1.62-4.42) ( $p<0.0001$ ) であることを示し

た。したがって、心臓血管疾患による死亡率に関しては、NT-proBNPのそれぞれ10倍増加についての未調整ハザード比は3.58 (2.40-5.36) ( $p<0.0001$ ) であり、共変数調整ハザード比は3.32 (1.90-5.81) ( $p<0.0001$ ) であった。

#### 【0181】

結論としては、上昇する循環NT-proBNPは、糖尿病性腎症における過剰な全体的および心臓血管疾患死亡率の独立した予測因子である。NT-proBNPの測定は、利用可能な方法に予測情報を付加し、糖尿病性腎症を有する1型糖尿病患者の管理処置の指針として役立つ。

#### 【0182】

##### 実施例3

腎症を有する1型糖尿病患者において、PIGFは年齢、性別、HbA1cおよび糸球体沪過値とは相関しないことが判明した。尿アルブミン排泄との相関性は弱かった。腎症を有する1型糖尿病患者においては、PIGFは何らかの原因による死亡率および心臓血管疾患による死亡率と相關した(図6および7)。

#### 【0183】

##### 実施例4

表4はSteno-2研究の患者におけるPIGFの分析を示す。全般的な研究計画は実施例1に記載されている。

#### 【表4】

心臓血管疾患と血漿 PIGF

	CVD イベントに関するベースライン予測因子としての血漿 PIGF(連続的)	CVD イベントに関するベースライン予測因子としての血漿 PIGF(中央値より低い/高い)
全 Steno-2 集団	ハザード比 1.073 (0.999-1.152), $p = 0.052$	ハザード比 1.22 (0.71-2.08), $p = 0.48$
集中治療群	ハザード比 1.21 (1.04-1.41), $p = 0.012$	ハザード比 2.19 (0.79-6.08), $p = 0.13$
通常治療群	ハザード比 1.03 (0.95-1.12), $p = 0.46$	ハザード比 1.04 (0.53-2.04), $p = 0.91$

#### 【0184】

##### 実施例5

55歳の2型糖尿病患者がかかりつけの開業医に来院した。NT-proBNP (357pg/ml)、PIGF (11pg/ml) および遊離(すなわち、血小板非結合) sCD40L (1,2pg/ml) を測定した。この患者は胸痛を訴えていない。NT-proBNP値は心疾患の存在を示している。この患者は心臓の精密検査のために心臓病専門医に回された。ECGおよび心臓トロポニンTは正常である。ロシグリタゾン (rosiglitazone) の投薬量を減少させ、ACEインヒビターおよび利尿剤での治療を開始した。その後、NT-proBNPは2週間隔でモニターし、2ヶ月後に117pg/mlのレベルに達した。さらに、心臓トロポニンTのレベルを定期的にモニターした。

#### 【0185】

##### 実施例6

62歳の女性の2型糖尿病患者が糖尿病専門医に来院した。NT-proBNP (37pg/ml)、PIGF (27pg/ml) および遊離sCD40L (1,0pg/ml) を測定した。NT-proBNPおよびPIGFは、細小血管症の主要特徴を伴う心臓血管合併症の存在またはリスクを示す。VEGFを測定し、診断を確認する。CMLおよびHbA1c (7.7%) を測定したが、それらは、不十分な血糖抑制を示す。この患者は、定期的な運動を行うよう及び小さな損傷または低酸素症の徵候に関して四肢を毎日点検するよう勧められた。スタチンおよびグリタゾンの投薬を開始した。グリタ

ゾンでの治療が心疾患のリスクの増加を引き起こすかどうかを調べるために、短い間隔でNT-proBNPを測定した。治療がうまくいっているかどうかをモニターするために、PIGF、AGE CMLおよびHbA1cを毎月測定した。

【図面の簡単な説明】

【0186】

【図1】全集団における中央値より低い（破線）または高いベースライン血漿NT-proBNP濃度を有する2型糖尿病患者における最初の心臓血管イベントまでの時間のカプラン-マイア（Kaplan-Meier）プロット。P値はログランク検定で求めた。Prop.w/o e, イベントを伴わない比率；t, 時間（月）；NAR, リスクを有する人数；bel.med., 中央値より低い群；ab.med., 中央値より高い群。

【図2】全集団における中央値より低い（破線）または高いベースライン血漿NT-proBNP濃度を有する2型糖尿病患者における心臓血管疾患による死亡またはうつ血性心不全による最初の入院までの時間のカプラン-マイア（Kaplan-Meier）プロット。P値はログランク検定で求めた。Prop.w/o e, イベントを伴わない比率；t, 時間（月）；NAR, リスクを有する人数；bel.med., 中央値より低い群；ab.med., 中央値より高い群。

【図3】steno-2研究における160人の2型糖尿病患者の集団の中央値より低い（破線）または高い血漿NT-proBNPを有する患者における追跡期間中の中央値血漿NT-proBNPレベルを示す。conc., 濃度；t, 時間（年）；ab.med., 中央値より高い群；bel.med., 中央値より低い群。

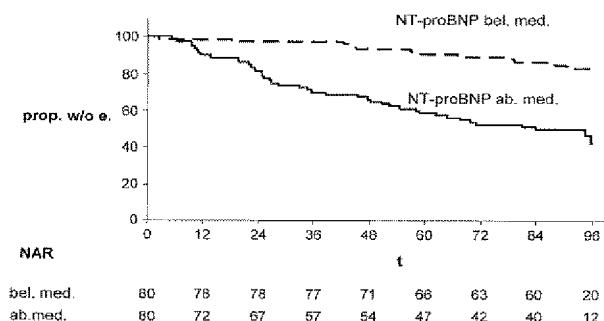
【図4】中央値（110ng/l）より高い又は低いNT-proBNP濃度を有する糖尿病性腎症患者における全原因による死亡率のカプラン-マイア（Kaplan-Meier）曲線（ログランク検定、 $p<0.0001$ ）。比較のために、正常アルブミン尿患者の曲線を細線で示す。Prop.d, 死亡率；t, 追跡期間（年）；nephrop., 腎症；normalb., 正常アルブミン尿；NAR, リスクを有する人数。

【図5】中央値（110ng/l）より高い又は低いNT-proBNP濃度を有する糖尿病性腎症患者における心臓血管疾患による死亡率のカプラン-マイア（Kaplan-Meier）曲線（ログランク検定、 $p<0.0001$ ）。比較のために、正常アルブミン尿患者の曲線を細線で示す。Prop.CVD, 心臓血管疾患による死亡率；t, 追跡期間（年）；nephrop., 腎症；normalb., 正常アルブミン尿；NAR, リスクを有する人数。

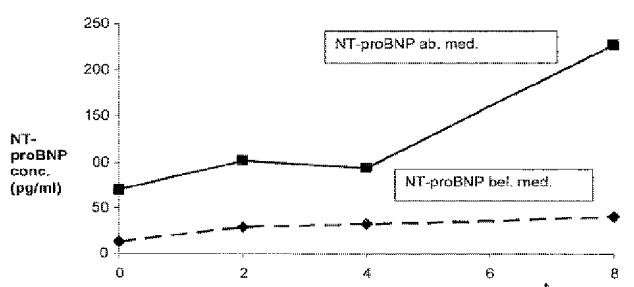
【図6】血漿PIGFに応じた1型糖尿病性腎症における全原因による死亡率を表すカプラン-マイア（Kaplan-Meier）プロット。データは実施例2に記載のとおり、steno-1研究中に集めた。1 - c.s., 1から累積生存率を差し引いた値；t, 追跡期間（年）。

【図7】血漿PIGFに応じた1型糖尿病性腎症における心臓血管疾患による死亡率を表すカプラン-マイア（Kaplan-Meier）プロット。データは実施例2に記載のとおり、steno-1研究中にデータを集めた。1 - c.s.CVD, 心臓血管疾患による死亡率からの累積生存率を1から差し引いた値；t, 追跡期間（年）。

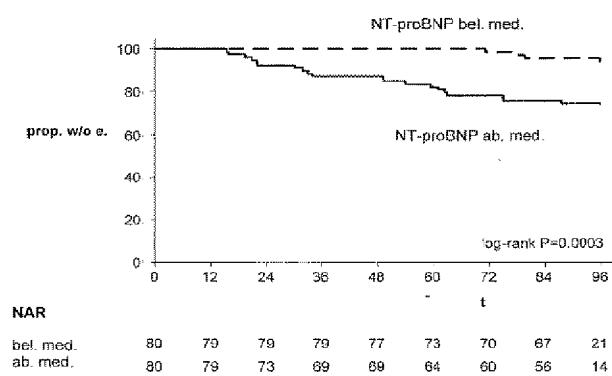
【図1】



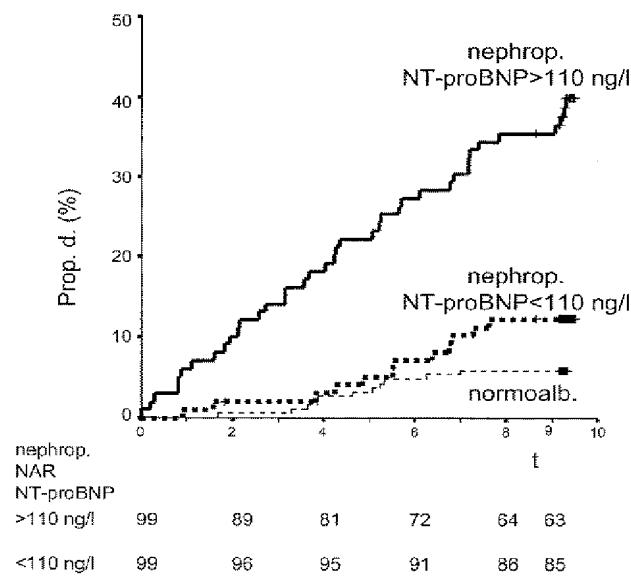
【図3】



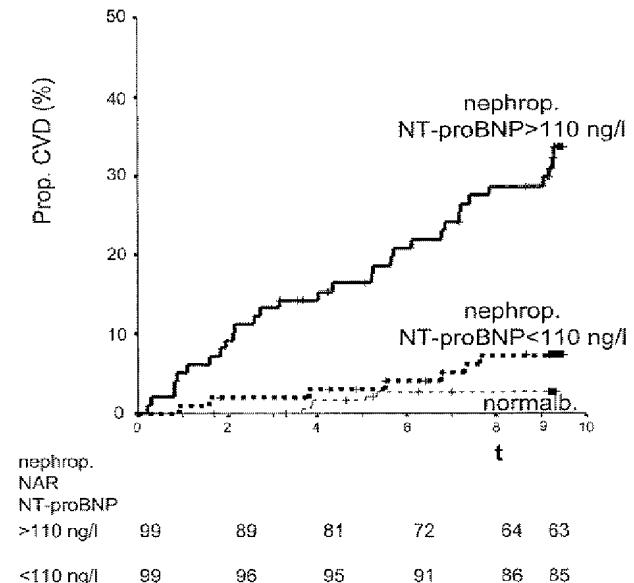
【図2】



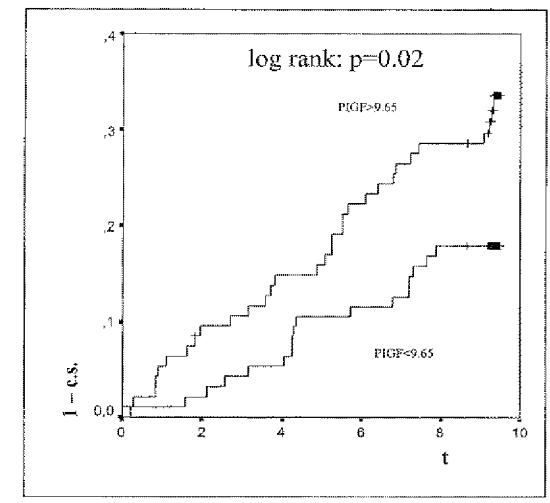
【図4】



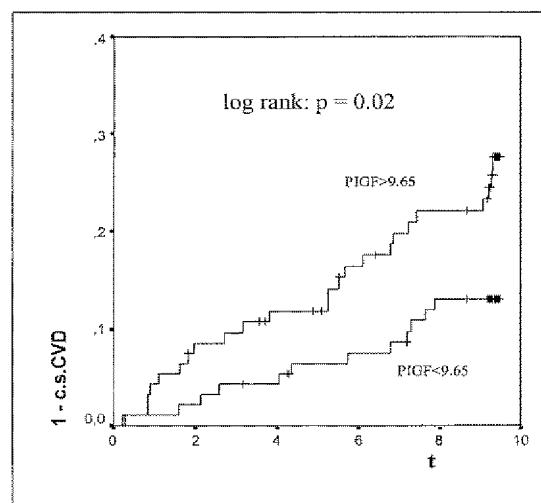
【図5】



【図6】



【図7】



(72)発明者 ゲオルグ ヘス  
　　ドイツ連邦共和国 55130 マインツ, オッペンハイマー シュトラーセ 82  
(72)発明者 アンドレア ホルシュ  
　　ドイツ連邦共和国 68259 マンハイム, クリストチャン-モルゲンシュターン シュトラーセ  
　　11  
F ターム(参考) 2G045 AA13 AA25 BB10 CA25 CA26 DA36 FB03 JA01 JA03

【外国語明細書】  
2006030183000001.pdf